

ФАРМАКОЛОГИЯ

О.Я.Лукивская, Л.Б.Заводник,
В.В.Садовничий, Н.Э.Петушок, В. У. Буко

АНТИОКСИДАНТНЫЙ ЭФФЕКТ УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ, ВЫЗВАННОМ γ -ОБЛУЧЕНИЕМ

Институт биохимии НАНБ, Гродно

Исследовали влияние урсодезоксихолевой кислоты (УДХК) (10 и 100 мг/кг веса тела) на свободные кислородные радикалы, перекисное окисление липидов (ПОЛ) и антиоксидантную защитную систему в печени и её субклеточных фракциях у крыс, подверженных однократному гамма-облучению (1 Гр). Обе дозы УДХК нормализовали в печени крыс показатели, увеличенные под влиянием облучения: содержание супероксиданиона в микросомах и карбонильных продуктов ПОЛ печени (алканали, алкенали, алкадиенали и кетоны), активность цитозольной супероксиддисмутазы и хемилюми-нисценцию, усиленную люминолом, в микросомах печени. Хемилюминисценция, усиленная люцигенином и содержание гидроксильных радикалов в печени снижались только под влиянием высокой дозы УДХК. УДХК предупреждала падение уровня восстановленного глутатиона в печени, однако активность ферментов обмена глутатиона не изменялась ни под влиянием облучения, ни введения УДХК. Полученные данные свидетельствуют, что исследуемый метаболит обладает выраженными антиоксидантными свойствами.

Урсодезоксихолевая кислота (УДХК) широко используется как гепатопротектор, стабилизирующий мембраны печени, при холестатических поражениях печени [1]. Будучи гидрофильной желчной кислотой, она защищает мембраны печени от повреждения избытком гидрофобных желчных кислот, конкурируя с последними за включение в

мембранные структуры. Недавно нами было обнаружено, что УДХК обладает свойствами перехватчика свободных кислородных радикалов и антиоксидантного агента [2]. В настоящей работе мы исследовали влияние двух доз УДХК на про-оксидантные и антиоксидантные факторы в микросомах крыс с окислительным стрессом, вызванным внешним γ -облучением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Белые крысы-самцы, весом 180-210 г, однократно подвергались воздействию γ -лучей (кобальтовая пушка) в дозе 1 Гр. Две группы облученных крыс дважды получали внутрижелудочно суспензию УДХК, 10 и 100 мг/кг массы, за 1 час до облучения и за 1 час перед декапитацией, которую осуществляли через 24 часа после облучения.

Микросомы выделяли методом дифференциального центрифугирования при 105000g [3] на центрифуге VAC-602 (Германия). Микросомальный белок определяли по методу Klinger and Muller [4]. Определение супероксидрадикала (O_2^*) было основано на восстановлении нитротетразолия синего посредством O_2^* до формазана [5]. НАДФН-зависимую хемилюминисценцию микросом измеряли с помощью хемилюми-нисцентных зондов, люминола и люцигенина. Активность супероксиддисмутазы (СОД) измеряли по методу Чевари и соавт. [6]. Карбонилсодержащие конечные продукты перекисного окисления липидов разделяли на классы в виде динитрофенилгидразонов тонкослойной хроматографией [7]. Ферментативное перекисное окисление липидов оценивали после инкубации микросом тиобарбитуровым методом. Нарботка H_2O_2 оценивалась тиоцианатным методом в присутствии NaN_3 [8]. Для определения восстановленного глутатиона (GSH), глутатионредуктазной и глутатионпероксидазной активностей использовались общепринятые методы [9, 10]. Результаты обрабатывались статистически по Стьюденту.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Однократное облучение крыс вызвало значительное увеличение содержания O_2^* в микросомах (Табл. 1). Примерно двукратно возрастала интенсивность НАДФН-зависимой хемилюминисценции, усиленной люминолом и люцигенином, заметно увеличивалась наработка гидроперекисей липидов в микросомах, стимулируемая железом и НАДФН. Отмечено увеличение содержания всех классов карбо-нилсодержащих продуктов липопероксидации: зоны III (алкенали, алканалялы и кетоны), зоны II (озазоны) и зоны I (гидроксиалкеналялы), разделённых методом ТСХ. У облученных животных почти на 80% повышалась активность СОД, тогда как активности глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы и наработка H_2O_2 существенно не изменялись. Уровень GSH в микросомах печени снижался достоверно, более, чем на 20%.

Введение УДХК облученным животным дозозависимо снижало содержание O_2^* в микросомах печени. Только высокая доза УДХК снижала интенсивность НАДФН-зависимой хемилюминисценции, усиленной люцигенином, тогда как интенсивность НАДФН-зависимой хемилюминисценции с люминолом падала под влиянием обеих доз препарата. УДХК не оказывала влияния на наработку H_2O_2 . В обеих группах, получавших УДХК, дозозависимо снижалось ферментативное образование перекисей липидов, соответственно на 24% и 36% для доз 10 и 100 мг/кг. Содержание карбонильных конечных продуктов перекисного окисления липидов, представленных алканалялами, алкадиеналялами, алкеналялами и кетонами (Зона III) не изменялось под влиянием УДХК, тогда как количество динитрофенилгидразонов в Зоне I, содержащей высоко-реакционные гидроксиалкеналялы, значительно уменьшалось под влиянием дозы 100 мг/кг.

Несмотря на увеличение содержания GSH в группах, получавших УДХК соответственно на 17% и 23% для доз 10 и 100 мг/кг, эти изменения не были статистически достоверными ни по сравнению с облучёнными животными, ни с контрольной группой. Обе дозы УДХК в одинаковой степени снижали активность СОД и не влияли на активность глутатионредуктазы. УДХК не

влияла также на активность глутатионпероксидазы, заметно повышенной у облученных животных.

Обсуждение. Как показано нами ранее, УДХК является достаточно эффективной ловушкой свободных кислородных радикалов [2]. Используя метод спиновых ловушек было продемонстрировано, что УДХК хорошо связывает O_2^* , не влияя на перехват гидроксильного радикала (HO^*) специфичной спиновой ловушкой POBN. Кроме того, УДХК дозозависимо снижал уровень O_2^* в микросомах, что подтверждает специфичность связывания O_2^* исследуемым соединением.

Введение УДХК облученным крысам угнетало или предупреждало, по крайней мере частично, изменения, вызванные в микросомах печени окислительным стрессом. УДХК нормализовала показатели, имеющие отношение скорее к O_2^* (содержание O_2^* и активность СОД), чем к HO^* (наработка H_2O_2). Считают, что НАДФН-зависимая хемилюминисценция, усиленная люминолом, отражает наработку O_2^* различными системами, тогда как эффект люцигенина более специфичен для HO^* , однако оба зонда могут отражать люминисценцию и таких активных форм кислорода, как синглетный кислород и др. Таким образом, мы не можем исключить, что УДХК угнетает не только наработку O_2^* , но и других активных форм кислорода.

СОД играет важную роль в защите клеток против повреждающего действия O_2^* . Значительное повышение активности этого фермента при у-облучении является адаптивной мерой, направленной на перехват O_2^* и предупреждение процессов перекисного окисления. УДХК, как ловушка свободных радикалов, принимает на себя значительную часть этой ответственности, нормализуя при этом активность СОД. Глутатионовая система также защищает клетки от токсического влияния активных форм кислорода. Частичное предупреждение потери GSH при введении УДХК облученным крысам также связывается с вышеописанными свойствами исследуемого соединения.

Резюмируя вышеизложенное, следует сказать, что УДХК является эффективным перехватчиком свободных кислородных ра-

дикалов и антиоксидантом в условиях *in vivo*. Нами также обнаружен достаточно выраженный эффект дозы 10 мг/кг, введенной только дважды, тогда как терапевтические дозы 10-20 мг/кг применяются в клинике в течение длительного времени, иногда до 2-6 месяцев [11]. Поэтому УДХК следует рассматривать, как перспективный агент для клинического использования в новом качестве антиоксидантного и радиопротекторного средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. James O.F.W. Ursodeoxycholic acid treatment for chronic cholestatic liver disease. J. Hepatol. 1990; 11: 5-8.
2. Buko V., Artsukevich A., Lukivskaya O. et al. Antiradical and antioxidative properties of compounds having the steroid structure. Current Top. Biophys. 1998; 22(Suppl 1): 33-39.
3. Карузина И.И., Арчаков А.И. Выделение микросомальной фракции печени и характеристика её окислительной системы. В книге: Современные методы в биохимии, М., Медицина, 1977; 42-78.
4. Klinger W., Muller D.. The influence of age on the protein concentration in serum, liver and kidney of rats determined by various methods. Z Versuchstierkd 1974; 16: 149-53.
5. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. Techniques in Free Radical Research. Amsterdam/London/New York/Tokyo: Elsevier, 1991; 85-91.
6. Чевари С., Чаба И, Секеи И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах в клетке и метод её определения в биологическом материале. Лаб. Дело, 1985; 11: 678-81.
7. Poli G., Dianzani M.U., Cheeseman K.H., Slater T.S., Lang J., Esterbauer H. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspension. Biochem. J. 1985; 227: 629-38.
8. Hildebrandt A.G., Roots ., Tjoe M., Heinemeyer G. Hydrogen peroxide in hepatic micro-somes. Methods Enzymol. 1978; 52: 342-50.
9. Akerboom T.P.M., Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glu-

tathione mixed disulfides in biological samples. Methods Enzymol 1981; 77: 373-382.

10. Кругликова А.А., Стутман С.М. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в печени крыс после введения селенита натрия. Укр. Биохим. Ж., 1976; 48: 223-228.

11. Queheu P.E., Montet J.C. Hepatoprotection by hydrophilic bile salts. J. Hepatol. 1994; 21: 260-8.

SUMMARY

We studied effects of ursodeoxycholic acid (UDCA) (10 and 100 mg/kg b.w.) on the free radical generation, lipid peroxidation and the antioxidant defense system in the liver of rats with oxidative stress caused by γ -irradiation. Both the doses of UDCA normalized the liver parameters enhanced by γ -irradiation: the content of superoxide anion and carbonyl-containing products of lipid peroxidation (alkanals, alkenals, alkadienals and ketones), the superoxide dismutase activity and the chemiluminescence enhanced by luminol. Only the highest dose of UDCA (100 mg/kg b.w.) decreased the chemiluminescence enhanced by lucigenin in liver micro-somes and the hydroxyalkenals content in the liver. UDCA prevented reduced glutathione depletion caused by γ -irradiation, whereas glutathione-related enzyme activities did not change under the influence of both the UDCA doses as well as γ -irradiation. Thus, the data obtained suggest that UDCA is a metabolite having the sufficiently effective antioxidant properties.

Таблица 1. Влияние УДХК на прооксидантные и антиоксидантные факторы в микросомах печени крыс, подвергнутых однократному у-облучению (1 Гр)

Показатели	Контроль	Облучение	+ УДХК, 10 мг/кг	+ УДХК, 100 мг/кг
Содержание супероксидади-кала, нмоль/мг белка	14.3±1.12	21.311.19*	17.211.21®	14.311.25®
Наработка H ₂ O ₂ , нмоль/мг белка за 1 мин.	0.39±0.05	0.4110.07	0.4510.06	0.4210.06
Хемилюминисценция, люци-генин, имп/мг белка/мин x 10 ⁶	1.97±0.24	3.9210.68*	3.5410.49*	1.8110.28®
Хемилюминисценция, люми-нол, имп/мг белка/мин x 1 О ^л	2.5710.75	5.7810.71*	3.5610.38®	3.3410.60®
Наработка перекисей липидов, нмоль /мг белка/мин	1.41±0.15	2.9610.23*	2.2510.17*®	1.8810.21®
Карбонилы, зона III, нмоль/мг белка	159±14	21616*	17917®	17717®
Карбонилы, зона II, нмоль/мг белка	74±5	9413*	82112	9014
Карбонилы, зона I, нмоль/мг белка	104±4	12813*	11414	10016®
GSH, цмоль/мг белка	6.3 ±0.28	5.0*10.14	6.010.19	6.510.21
Глутатионредуктаза, микросомы, U/мг белка	19.311.32	17.211.03	17.611.21	20.41.91
Глутатионпероксидаза, цито-золь, U/мг белка	99112	120125	116122	134119
СОД, цитозоль, U/мг белка	22.2±2.56	39.613.34*	27.512.29®	26.712.24®

* - P<0,05 по сравнению с контролем;

®- P<0,05 по сравнению с облученными крысами.